

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16044

研究課題名（和文）不死化ヒト皮膚付属器細胞の作製とヒト毛包再構築

研究課題名（英文）Establishment of immortal skin appendage cells and regeneration of human hair follicles

研究代表者

木曾 真弘（Kiso, Masahiro）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・医師

研究者番号：20769517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：毛包の発生や毛周期における成長期誘導は上皮と間葉系細胞の相互作用によって行われているが、間葉系細胞の鍵となる細胞が毛乳頭細胞である。毛乳頭細胞を2次元下で培養すると速やかに増殖能と毛包誘導能が失われる。本研究ではヒトの毛乳頭細胞の培養に成功した。更に、TERT遺伝子とBMI1遺伝子の両方をヒトの毛乳頭細胞に導入することで、増殖能が向上した。遺伝子導入した毛乳頭細胞はFGF7遺伝子の発現量が増加することを示した。それにより周囲の毛包再生環境を整え、高い毛包誘導能を維持することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毛乳頭細胞の培養方法は確立されておらず、移植するのに十分な毛包誘導能を維持した毛乳頭細胞を培養することが難しいため、毛包再生治療は現存する毛包を株分けして行う植毛が行われている。しかし、脱毛範囲の広い患者では、十分量の毛髪を採取することが困難であり、代替治療の開発が求められている。本研究で樹立した毛乳頭細胞は毛包誘導能と増殖能を維持しており、今後、患者から毛乳頭細胞を採取し、培養増殖させることで自家移植に貢献出来る。更に遺伝子導入した細胞は、高い毛包誘導能を有しており、今後、毛包再生のメカニズムの研究や薬剤スクリーニングなどにも生かせることが期待出来る。

研究成果の概要（英文）：Dermal papilla cells (DPCs), one of the mesenchymal cells, play key roles on hair follicle development and induction of anagen phase during hair growth cycle. The proliferating ability and inductivity of DPCs are rapidly lost during the 2-dimensional culture. In this study, we succeeded in culturing human DPCs. Moreover, we demonstrated that the proliferative ability of human DPCs was improved by transfection with hTERT and hBMI1 genes. It was shown that the gene expression level of FGF7 increased in transfected DPCs. We suggest that the surrounding hair follicle environment is regulated by releasing FGF7 and the high hair inductive activity is restored.

研究分野：皮膚科

キーワード：毛乳頭 不死化 TERT BMI1 毛包誘導能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脱毛症は致命的な疾患ではないが、整容面では Quality of life が著しく低下する。出生時、ヒトの体全体では約 500 万本の毛が発生するが、生後に増加することはないとされている (Paus R, et al. N Engl J Med 1999)。毛の発生やヘアサイクルの維持には上皮と間葉系の細胞の相互作用が重要である (Driskell RR, et al. J Cell Sci 2011)。毛乳頭細胞は毛包発生、維持に重要な細胞であり、毛包の基部に存在する間葉系由来の細胞であるが、一旦 2 次元培養下に置かれると、速やかに増殖能や毛包誘導能が失われる。現在、男性型脱毛症の治療として、後頭部の毛包を採取し、脱毛部に自家移植する方法は存在する。しかしながら、脱毛範囲が大きい場合など、自家移植の限界を生じる。そのため、移植に十分な量の毛乳頭細胞を、毛包誘導能を維持しながら培養することが重要となる。

毛乳頭細胞が増殖能を失う一つの理由はテロメアの短縮である。染色体 DNA の両端はテロメアと呼ばれ、染色体を保護する役割があるが、細胞分裂のたびにテロメア DNA は少しずつ短くなる。一定以上テロメアが短くなると、やがて細胞は分裂しなくなるが、一部の生殖細胞ではテロメアが短くならないようテロメラーゼという酵素が作用し、DNA が伸長される。人為的にテロメア逆転写タンパク質 (TERT) を強制発現させると、細胞は十分なテロメア鎖長を維持することができ、細胞を不死化させることができる。また、不適切な培養環境では p16^{INK4a} が蓄積することで細胞増殖が停止するが、それを抑制する働きのある B-cell-specific moloney murine leukemia virus insertion region 1 (BMI1) という転写因子を TERT と同時に遺伝子導入することで、p16^{INK4a}/Rb pathway を不活性化し、上皮細胞を不死化できることが報告されている (Haga K, et al. Cancer Sci 2007)。

我々は以前にマウスの毛乳頭細胞に TERT と BMI1 を遺伝子導入し、毛包誘導能を維持した不死化毛乳頭細胞を樹立したことを報告した (Kiso M, et al. J Dermatol Sci 2018)。

本研究では、ヒト毛乳頭細胞に TERT と BMI1 を遺伝子導入し、毛包誘導能や増殖能を評価する。また、TERT 単独、BMI1 単独を遺伝子導入した毛乳頭細胞を作成し、両者を遺伝子導入した毛乳頭細胞と比較する。さらに、発毛した毛包を病理学的に評価し、毛乳頭細胞の遺伝子プロファイルリングを解析することで発毛にかかわるメカニズムを検証する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト頭皮より毛乳頭細胞を単離し、適正な条件下で培養して増殖させ、TERT 遺伝子や BMI1 遺伝子を遺伝子導入し、毛包誘導能と増殖能を維持した毛乳頭細胞を作成することである。さらに、TERT 遺伝子単独、BMI1 遺伝子単独、空ベクターを遺伝子導入したヒト毛乳頭細胞と比較し、TERT 遺伝子や BMI1 遺伝子を導入することがどのように毛乳頭細胞の性質に影響するか検討し、毛乳頭細胞における発毛や増殖能に関わる因子を同定する。

3. 研究の方法

毛乳頭細胞採取、培養

ヒト頭部余剰皮膚より毛乳頭細胞を 3 回採取し、Dulbecco 's Modified Eagle Medium low glucose (D-MEM) に 1% Penicillin-Streptomycin Solution (P/S) と 10% Platelet Rich Plasma (PRP) を混合した培地で培養した。7 継代目からは Dulbecco 's Modified Eagle Medium low glucose (D-MEM) に 1% Penicillin-Streptomycin Solution (P/S) と fibroblast growth factor 2 (FGF2) (10 ng/ml) を混合した培地で培養した。

毛包再構築実験 (チャンパー法)

妊娠 17.5-18.5 日目の C57BL/6 マウスの胎児マウスの皮膚を剥離し、500PU ディスパーゼ 1 と混合し 4 で 2.5 時間攪拌する。表皮と真皮を顕微鏡下で剥離し、それぞれを 500PU ディスパーゼ 1 と 0.2mg のコラゲナーゼタイプ 1 と混合し、37 で 1 時間攪拌する。Balb/c nu/nu マウスの背部に挿入したシリコンチャンパーの中に、ピペットを用いて表皮と毛乳頭細胞の混合液を挿入した。また、胎児マウス表皮のみをネガティブコントロール、胎児マウス真皮と表皮の混合液をポジティブコントロールとして移植した。移植 1 週間後にシリコンチャンパーを摘出し、1-3 週間後に発毛の有無を確認した。

病理組織学的評価

移植を行った Balb/c nu/nu マウスの背部組織を採取し、20%中性緩衝ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋し、ミクロトームで 3µm に薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。さらに、ヒトの核小体に対する抗体 (anti-human nucleoli antigen) を 1 次抗体、抗マウス抗体を 2 次抗体として免疫染色を行い、ヒトの ribosomal RNA に特異的なプローブ (Human Cytoplasm Stain Probe) を用いて *in situ hybridization* を行った。

4. 研究成果

ヒト毛乳頭細胞への遺伝子導入

我々は国立国際医療研究センターの倫理委員会の承認を経て、患者から採取した頭部余剰皮膚からヒト毛乳頭細胞(dermal papilla cell)を単離、培養し、hDP1、hDP2、hDP3 と名付けた。レンチウイルスベクターを用いて *TERT* 遺伝子と *BMI1* 遺伝子(hDP-TB)、*TERT* 遺伝子単独(hDP-T)、*BMI1* 遺伝子単独(hDP-B)を遺伝子導入した。また、コントロールとして空ベクターを導入した毛乳頭細胞(hDP-E)を作成した。

遺伝子導入した毛乳頭細胞と遺伝子導入していない毛乳頭細胞で細胞の形態は変化がなかった。

その後、RT-PCRにて *TERT* 遺伝子と *BMI1* 遺伝子の発現を比較した。*TERT* 遺伝子を導入した hDP-TB と hDP-T は *TERT* 遺伝子を発現していた。一方で、全ての細胞で *BMI1* 遺伝子の発現を認めた。

遺伝子導入したヒト毛乳頭細胞の増殖能

遺伝子導入した後、薬剤耐性を獲得した hDP-TB、hDP-T と hDP-E はピューロマイシン(0.75 μ l/ml)、hDP-B はハイグロマイシン(2 μ l/ml)で薬剤セクションを行った。抗生剤投与後、hDP-TB の 10%、hDP-T と hDP-B の 20%の細胞が生き残り、hDP-E は全ての細胞が薬剤耐性を示した。遺伝子導入後の population doubling(PD)は薬剤セクション開始 7 日目を 0 日とし、hDP-TB は PD=10.6、hDP-T は PD=5.5、hDP-B は PD=3.6 であり、hDP-TB は増殖能が向上していることを確認した。また、全ての細胞は約 30-50 日で増殖能が停止した。

遺伝子導入したヒト毛乳頭細胞の毛包誘導能

ヒト毛乳頭細胞は2次元の培養下では早期に毛包誘導能が失われるとされている(Ohyama M, et al. J Cell Sci 2012)。毛包再構築実験(チャンパー法)を行い、各遺伝子導入した毛乳頭細胞の毛包誘導能を確認した。

hDP-TB では毛包発生率 77%(10/13)であり、最長 20 継代の毛乳頭細胞でも発毛が認められた。また最小移植細胞数の 5×10^5 個でも発毛が認められ、高い毛包誘導能を確認できた。一方で hDP-T、hDP-B、hDP-E では発毛を認めなかった。また、それぞれの移植にて、ネガティブコントロールでは全て発毛が確認されず、ポジティブコントロールは発毛が確認された。

再生毛包の病理学的評価

hDP-TB を移植し、再生した毛包を採取した後に、H.E.染色を行った。再生した毛包は成熟毛包であった。同じサンプルにおいて抗ヒト核小体抗体を用いて免疫染色を行ったが、再生した毛包の毛乳頭や dermal sheath は染色されなかった。さらに、ヒトのリボソーム RNA に対する probe を用いて *in situ hybridization* を行ったが、ヒトの細胞は再生した毛包の毛乳頭や dermal sheath に確認できなかった。

今回我々は、B6 胎児マウスの上皮細胞と毛乳頭細胞をシングルセルにして移植したが、以前、マウス上皮細胞とヒト毛乳頭細胞を専用の培養皿にて培養し、spheroid を作成してから移植し、移植した毛包にヒト毛乳頭細胞を確認している報告がある(Yoshida Y, et al. Biochem Biophys Res Commun 2019)。また、発毛には上皮細胞と毛乳頭細胞の相互作用が重要であるが、シングルセルより、spheroid にすることで、その作用を強化し発毛効率を上げることが報告されている(Osada A, et al. Tissue Eng 2007)。今回、シングルセルで移植実験をおこなったことから、移植したヒト毛乳頭細胞とマウスの上皮細胞の接着が密ではなかったため、ホスト(ヌードマウス)の毛乳頭細胞とマウスの上皮細胞との相互作用によって発毛した可能性が考えられる。negative control や hDP3-T、hDP3-B では全ての移植において発毛がなかったことを考慮すると、hDP-TB が発毛環境を整え、ホストの毛乳頭細胞とマウスの上皮細胞との相互作用に影響を与えたことが考えられる。以前より、ヒト毛乳頭細胞は collagen type やラミニンなどの細胞外基質を分泌することや、VEGF を分泌して血管新生を促し、発毛環境を整えること(Bassino E, et al. Experimental Dermatol 2015)が知られている。今回、hDP-TB が分泌するどのような因子によって発毛に寄与したか調べるために遺伝子プロファイリングをおこなった。

毛乳頭細胞の遺伝子プロファイリング

次に、hDP1-TB、hDP3-TB、hDP3-T、hDP3-B、hDP3-E の合計 5 つの毛乳頭細胞より RNA を抽出し、RNA sequencing を施行した(DNA チップ研究所に依頼)。hDP3-E より hDP1-TB、hDP3-TB で 2 倍以上の発現上昇があった遺伝子はそれぞれ 1537 個と 1874 個であった。hDP3-E と比較して hDP3-TB と hDP1-TB で共通して 2 倍以上発現が上昇していた、715 個の遺伝子のう

ち、毛包関連遺伝子の *Fibroblast growth factor 7 (FGF7)* と *COL7A1* を選択した。我々は更に、quantitativePCR にて hDP-TB と hDP-E のそれぞれの遺伝子発現量を比較した。hDP3-TB は有意に *FGF7* の発現が上昇していたが、*COL7A1* は発現量の差を認めなかった。

FGF7 は毛乳頭細胞より分泌される増殖因子であり、FGF7 をノックアウトしたマウスでは発毛がないことや、ヌードマウスに投与することで発毛を促すことから、発毛や毛包上皮分化に重要であることが知られている (Dimitry M, et al 1995)。発毛のあった hDP3-TB では *FGF7* の発現が上昇していたことから、hDP-TB は FGF7 の分泌が増加することで毛包誘導能が増したと推察された。

我々の研究ではヒト培養毛乳頭細胞に *TERT* 遺伝子と *BMI1* 遺伝子を遺伝子導入することで、増殖能と毛包誘導能を維持した毛乳頭を樹立できることが確認できた。また、移植後、再生した毛包にはヒト由来の細胞が確認できなかったことから、移植したヒト培養毛乳頭細胞が FGF7 を含めたパラクライン効果により、マウスの発毛環境を整え、発毛に寄与していることが考えられる。また、毛包誘導能を維持した培養毛乳頭細胞を作成した事により、今後、作成した細胞が毛包誘導能のメカニズムや薬剤のスクリーニングなどに生かせる事も期待出来る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kiso Masahiro	4. 巻 90
2. 論文標題 Introduction of the TERT and BMI1 genes into murine dermal papilla cells ameliorates hair inductive activity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 218-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2018.02.003.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----